

## НОВОСТИ НАУКИ

### В ПОГОНЕ ЗА ГЕНОМ В ОДНУ ТЫСЯЧУ ДОЛЛАРОВ

**Быстрый низкозатратный генетический анализ в скором времени станет реальностью, а его результаты - плохие или же хорошие - повлияют на жизнь каждого человека.**

С каждым годом совершенствуется и дешевеет не только компьютерная техника. Цены на секвенирование генома также постепенно снижаются. Для проведения первого секвенирования генома 5 лет назад была составлена смета приблизительно в 300 миллионов долларов. Окончательная оценка стоимости, учитывающая стоимость всех технологий, которые сделали возможным секвенирование генома, составила около 3 миллиарда долларов. В марте этого года ученые подсчитали приблизительную стоимость проведения секвенирования генома примата (макака резус); она составила около 22 миллионов долларов. К концу текущего года ожидается, что по крайней мере одна из фирм, специализирующихся на секвенировании генома, планирует предложить полное секвенирование генома млекопитающих по цене 100 000 долларов. Таким образом, за последние 6 лет затраты на проведение этого анализа снизились в 3000 раз, и это далеко не предел. Ученые заканчивают разработку технологий нового поколения, которые, как они надеются, позволят снизить стоимость секвенирования генома до 1000 долларов. По словам Kevin McKernan, руководителя исследовательских работ в Agencourt Bioscience, Beverly, Massachusetts, технологии развиваются гораздо более быстрыми темпами, чем это ожидалось.

Jeffrey Schloss, руководитель грантовых программ по геномному секвенированию в National Human Genome Research Institute (NHGRI), Bethesda, Maryland, соглашается, что никто не мог предположить, что ученым удастся настолько продвинуться вперед за такой короткий период. Он также добавляет, что производители технологий воодушевлены, так как создаваемые ими технологии действительно работают, но в тоже время и проявляют некоторую нервозность, поскольку конкуренты не дремлют.

Совокупность новейших технологий по секвенированию генома была представлена на конференции: "Достижения в геномной биологии и технологии", проходившей с 8 по 11 февраля 2006 года, Marco Island, Florida. Хотя на конференции речь прямо не шла о том, что снижение затрат на проведение секвенирования генома будет доведено до 1 000 долларов, ученые нисколько не сомневаются, что такая вероятность реально существует. По мнению George Church из Harvard University, одного из пионеров секвенирования генома, - итоги конференции убеждают в том, что нет физических ограничений на появление технологий, которые позволят секвенировать геном за 1000 долларов.

Снижение себестоимости секвенирования генома уже сегодня способствует развитию фундаментальных исследований в разных направлениях, таких, например, как: регуляция активности гена, анализ генетической предрасположенности к раковым заболеваниям. По мере продолжающегося падения цен секвенирование будет коренным образом менять подходы как биологов к поискам генов, вызывающих заболевание, так и врачей к диагностике и лечению. Некоторые исследователи говорят, что именно дешевые технологии по секвенированию гена могут окончательно открыть путь к внедрению персонализированной медицины в широкую практику. Dennis Gilbert, руководитель исследовательских работ в "Applied Biosystems", - ведущей компании по производству технологий для геномного секвенирования, Foster City,

California, - отмечает, что дешевые технологии секвенирования геномов наиболее важны для понимания основ возникновения и развития раковых опухолей, где геном видоизменяется с течением времени. Создание таких технологий потребует мультидисциплинарного подхода. Конечно же, такие нововведения сопряжены с определенным риском. Ученые опасаются, что дешевое секвенирование может создать угрозу биотерроризма, а также вторжения в конфиденциальную информацию о пациенте.

Первая группа исследователей, которой удастся создать технологию по секвенированию генома человека с затратами в 1000 долларов получит денежное вознаграждение, а также возможность потенциальных доходов в будущем. В сентябре 2003 года организация J. Craig Venter Science Foundation пообещала вознаграждение в 500 000 долларов за это достижение. Идея была подхвачена организацией X Prize Foundation, Santa Monica, California, которая, как ожидается, поднимет вознаграждение до размера 5-20 миллионов долларов. Однако, настоящее соревнование развернулось в самом начале 2004 года, когда National Institutes of Health начал грантовую программу в 70 миллионов долларов для поддержки ученых, разрабатывающих технологии секвенирования генома млекопитающих с первоначальной себестоимостью 100 000 долларов, и нацеленных на достижение конечной стоимости 1000 долларов. George Church утверждает, что эта программа произвела потрясающий эффект на научное сообщество, воодушевив исследователей на поиск новых идей. Такой подъем в свою очередь привел к появлению многочисленных компаний, каждая из которых работает над созданием своей технологии секвенирования.

Усилия направлены на то, чтобы улучшить или заменить технологию, впервые созданную в середине 1970х годов учёным Fred Sanger, UK Medical Research Council, которая лежит в основе современных секвенаторов. Метод включает умножение копий ДНК, которые должны быть секвенированы путём "разрезания" их на мелкие фрагменты и использования в качестве матриц для синтеза нитей ДНК, являющихся точными и комплементарными дополнениями первоначальной последовательности. Синтез в сущности имитирует клеточные процессы при копировании ДНК. Технология основывается на использовании модификаций четырёх оснований ДНК, каждое из которых помечено различным флуоресцентным маркером. Короткий фрагмент - праймер - инициирует синтез в определенном месте на матрице ДНК, а модифицированные основания, которые находятся в незначительном количестве в смеси реагентов, используемых для проведения синтеза, останавливают этот процесс. Это происходит, когда одно из них присоединяется к концу растущей нити ДНК. В результате появляется смесь синтезированных фрагментов ДНК, каждый из которых начинался в одной и той же точке цепи ДНК, но заканчивается в разных местах цепи.

Современные секвенаторы разделяют эти фрагменты, пропуская смесь через тонкие капилляры, содержащие гель; чем короче фрагмент, тем быстрее он движется через гель. Этот процесс, известный как капиллярный электрофорез, настолько эффективен, что фрагмент, выходящий из капилляра, отличается от предшествующего всего лишь на одно основание. Каждый появляющийся фрагмент облучается лазером, который вызывает флуоресценцию модифицированного нуклеотида на конце фрагмента.

Компьютер идентифицирует эти основания и последовательность, с которой они появляются. В результате получают миллиарды последовательностей, которые вводятся в суперкомпьютер и обрабатываются с помощью программ, распознающих образы, которые находят перекрывающиеся участки и собирают эти "кусочки" в полную последовательность генома. Длинный список улучшений систем капиллярного электрофореза в сочетании с возрастанием автоматизации и совершенствованием программного обеспечения снизили стоимость секвенирования в 13 раз по сравнению с 1990 годом.

Большинство новых технологий нацелено на то, чтобы еще больше миниатюризировать, увеличить пропускную способность и автоматизировать этот процесс. Эти технологии делятся на 3 группы. Первая, называемая секвенирование синтезом, считывает основания по мере того, как они добавляются к растущей нити ДНК. Вторая группа технологий секвенирует единичные молекулы ДНК, и третья группа, куда входит нанопоровая технология секвенирования, "протягивает" ДНК через мельчайшую пору и при помощи электронной или оптической системы регистрации позволяет считывать основания по мере их прохождения.

Стратегия "секвенирования при помощи синтеза" пока лидирует. Действительно, компания "454 Life Science Corp. In Branford", Connecticut, уже имеет коммерческий вариант технологии. В 2005 году ими были проданы 20 установок. При помощи оборудования для пиросеквенирования, выпускаемого этой компанией, геном сначала разбивается на мелкие фрагменты от 300 до 500 пар оснований, двойная нить ДНК при этом расплетается и соединяется с пластиковой микросферой (на каждую микросферу приходится одна нить). Затем эти фрагменты копируются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) до тех пор, пока копии не покроют всю поверхность микросферы. Микросферы разделяются на плашке, содержащей порядка 1,6 миллионов ячеек, в которые последовательно добавляются реагенты для сиквенса и нуклеотиды. Каждый раз, когда нуклеотид присоединяется к растущей цепи ДНК, в результате реакции освобождается пирофосфат, который в свою очередь связывается ферментом люциферазой, находящимся в ячейках, вызывая люминесценцию. Проводя корреляцию регистрируемой люминесценции в каждой ячейке с нуклеотидами, присутствующими в ней, компьютер прослеживает последовательности растущих цепей сотен и тысяч фрагментов ДНК одновременно.

В августе 2005 года исследователи из 454 Life Science сообщили, что ими секвенирован геном бактерии *Mycoplasma genitalium* размером почти 600000 оснований с точностью 99,4 %, а также геном размером более чем 2,1 мега - оснований бактерии *Streptococcus pneumoniae* (журнал Science, 5 августа 2005 г., стр. 862). На конференции во Флориде, Michael Egholm, вице-президент, ответственный за молекулярно-биологическое направление в компании 454 Life Science Researches, представил доклад, в котором сообщалось о секвенировании геномов четырёх микроорганизмов с точностью 99,99%. Высокая точность секвенирования является критичным параметром потому, что геномы, например, здоровой и раковой клеток могут отличаться только в одной миллионной части.

David Bentley, научный руководитель исследований компании Solexa, Little Chesterford, UK, также сообщил о достигнутом успехе. При помощи метода, подобному тому, что был использован 454 Life Science, исследователи Solexa превращали отдельные фрагменты ДНК в набор приблизительно из 1000 точных копий. Вместо пришивки отдельной нити ДНК к микросфере, исследователи закрепляли каждую нить в различных точках на стеклянной пластине, подобно тому, как поступают при создании стандартных микрополей. После этого нити дублируются и создается огромное количество колоний ДНК. Конечная стадия, сходная с секвенированием по Сэнгеру, включает использование флуоресцентно меченых нуклеотидов четырех разных "цветов" и стандартную оптику, используемую при анализе микрополей, чтобы одновременно проследить рост нитей ДНК, комплиментарных к тем, которые прикреплены к стеклу подложки. Bentley заявил, что его группа секвенировала фрагмент ДНК человека длиной 162-тысячи оснований и сравнила ее со стандартной последовательностью, полученной в рамках программы Human Genome Project. Точность секвенирования оказалась более 99,99% и были обнаружены все 162 сайта единичных нуклеотидных замен (SNP), присутствующие в данном участке генома.

Church разработал слегка отличающийся подход к секвенированию, получивший название секвенирование лигированием. При использовании этого метода исследователи начинают работу с короткой нити ДНК, прикреплённой к

микросфере или какой-либо поверхности. После этого они добавляют другую короткую нить ДНК, называемую якорным праймером, который связывается с известным участком на нити ДНК. Затем дополнительные девяти-нуклеотидные праймеры, так называемые зондовые праймеры, добавляются в смесь. Эти праймеры созданы так, что покрывают все возможные комбинации последовательности, и каждый из них имеет флуоресцентно-меченый нуклеотид А, G, T или C только в одной позиции. Короткий праймер с правильной комплиментарной последовательностью фермент лигаза пришивает к якорному праймеру, чем удерживает его на поверхности, в то время как другие праймеры, которые связаны менее прочно, смываются. Затем поверхность облучается лазером, что вызывает флуоресценцию на определенной длине волны, которая показывает, какое из оснований связалось. После удаления зондового и якорного праймеров добавляют другой якорный праймер для идентификации следующего основания на матричной нити ДНК. По мнению McKernan, такая технология позволяет секвенировать около 200 миллионов оснований в день и к августу 2006 года это число может вырасти до 3 миллиардов в день.

Несмотря на успехи секвенирование синтезом имеет свои недостатки. Таким способом можно обрабатывать относительно короткие фрагменты ДНК, обычно длиной несколько сот или менее пар оснований фрагментов, в то время как с помощью существующей капиллярной системы - около 1000. Это может усложнить комбинирование всех фрагментов для получения целого генома. Другим недостатком является использование дорогостоящей ПЦР, которая не исключает ошибок копирования. Такое положение вещей можно исправить путем экспериментов с технологией секвенирования и приобретения большего опыта в этой области. Например, группой Egholm, 454 Life Science, разработана новая версия технологии, которая повышает читаемую длину со 100 пар оснований до 400. Несколько групп разрабатывают способы секвенирования одиночной копии длинной нити ДНК, таким образом, достигая большей читаемой длины без использования ПЦР.

В подходе, который разрабатывает компания VisiGen Biotechnologies, Houston, Texas, полимеразы - фермент, который добавляет нуклеотиды к растущей цепи ДНК - прикрепляется к поверхности, а ДНК - матрица находится в растворе. По мере того, как полимеразы добавляют флуоресцентно меченные основания к комплиментарной цепи ДНК, усовершенствованная оптическая система детектирует слабые свечения единичной молекулы, что дает возможность прочесть непрерывную последовательность. Другая версия этого подхода, развиваемая компанией LI-COR Boisciences, Lincoln, Nebraska, предполагает фиксацию односторонней ДНК и полимеразных молекул на поверхности электрода и использование электрического поля для переноса к полимеразе находящихся в растворе нуклеотидов, связанных с флуоресцентными наночастицами. В промежутки между моментами, когда полимеразы связывают нуклеотид и когда она его срезает, отделяя наночастицы, исследователи изменяют направление электрического поля, удаляя пары нуклеотид-наночастица, не связанные с ДНК. Затем они делают снимок, по которому судят о цвете флуоресцентных частиц, всё еще связанных с полимеразой. Как только нуклеотид освобождается от наночастицы, последние удаляются, и процесс повторяется для определения следующего основания. На конференции John Williams, LI-COR, предсказал, что этот метод может позволить читать последовательности длиной до 20000 оснований.

По мнению Church, другая технология, известная как нанопоровое секвенирование, может внести еще более революционные изменения. Эта технология нацелена на секвенирование нитей ДНК, в то время как они протягиваются через узкие синтетические или природные поры до 1,5 нанометров в диаметре. Многочисленные группы развивают технологии создания синтеза нанопор, однако исследователи признают, что предстоит еще много работать в этом направлении.



Пока еще ни одна группа не сообщила об использовании такого прибора для секвенирования всей модели ДНК за один раз. Однако, начиная с 1996 года, группой исследователей под руководством John Kasianowicz и Daniel Branton, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, был проведен ряд исследований, которые обосновывают возможность использования пор, образованных белками, внедренными в липидную мембрану, для детектирования фрагментов ДНК, а также возможность различать синтетические фрагменты, содержащие либо только основания А, либо только С.

Поскольку белки и липиды не очень стабильные структуры, другие группы с целью создания более совершенной технологии начали конструирование пор из силикона и других материалов, используемых в электронике, которые позволяют интегрировать в них мельчайшие электронные устройства. В большинстве нанопоровых технологий исследователи используют крошечные транзисторы для контроля электрического тока, проходящего через поры. При прохождении четырех разных оснований ДНК, они преобразуют электрический сигнал, вызывая изменение напряжения, которое используется для идентификации проходящего нуклеотида.

На конференции химик Gregory Timp, University of Illinois, сообщил, что его группа провела электрическое секвенирование ДНК, проходящей через нанопоры. К сожалению, ДНК двигалась “вперед-назад”, и у исследователей были проблемы с секвенированием оснований цепи. Однако, Timp сообщил, что его группа заканчивает создание прибора второго поколения, в котором используются электрические поля для удержания ДНК под контролем. Если это действительно сработает, то с помощью такой технологии станет возможным читать протяженные фрагменты ДНК без использования дорогостоящих детекторов.

Вне зависимости от того, какая технология или же технологии производятся для рынка, понижение стоимости секвенирования для науки неосцимемо, поскольку оно окажет сильный положительный эффект на развитие биологии.

Прогресс в этой области уже налицо. На конференции во Флориде Egholm сообщил, что его команда использовала свою технологию для определения четырех генетических вариантов вируса иммунодефицита человека (HIV) в одном образце крови (используемый сегодня метод позволяет секвенировать доминирующую ДНК). По мнению Egholm, технология с течением времени даст возможность врачам определить лекарственно-устойчивые HIV ДНК в крови пациентов на более ранних стадиях. Авторы другого исследования быстро проанализировали последовательность немелкоклеточного рака лёгкого и выявили специфические мутации, которые способствуют увеличению устойчивости к лекарству.

Thomas Albert и его коллеги в NimbleGen Systems - фирме по производству биотехнологий (Madison, Wisconsin), провели аналогичные исследования, где использовали свою версию технологии секвенирования синтезом для определения мутации в *Helicobacter pylori*, способствующих устойчивости к препарату метронидазол, а также мутаций в микобактерии туберкулеза, вызывающих устойчивость к лекарственным препаратам. Эти исследования вселяют надежду на более эффективную борьбу с социально-значимыми заболеваниями. Некоторые из стратегий персонифицированной медицины уже внедрены в практику: например, герцептин назначается пациентам со специфичной генетической формой рака молочной железы. Дешевое секвенирование будет способствовать более широкому распространению стратегий персонифицированной медицины.

Ученые, занятые фундаментальными исследованиями, также с большими ожиданиями смотрят на возможность дешевого секвенирования. На конференции Snyder сообщил об использовании его командой геномных чипов для картирования мест связывания факторов транскрипции с геномом. Технология эффективна, но геномные чипы стоят дорого. Поэтому Snyder обращается к дешевой технологии секвенирования для быстрого секвенирования миллионов фрагментов ДНК, необходимых для решения данной проблемы.

Как и большинство новых технологий, ультрадешевая технология секвенирования также может иметь негативные последствия. Трудно представить, какая конфиденциальная информация будет доступна тому, кто будет обладать образцом вашей ДНК, поскольку это позволит определить вашу личность, наследственность, болезни, которые, возможно, передались вам по наследству. Популярные люди и политики могут вскоре увидеть мир, жаждущий досконально изучить их геномы. Что же касается “простых смертных”, многие аналитики высказывают опасения по поводу того, что страховые компании и работодатели будут использовать генетическую информацию для того, чтобы не иметь дела с людьми, которые обладают высоким процентом риска развития заболеваний. Также, одни и те же технологии могут помочь создать новые полезные микробы, например, те, которые можно приспособить к превращению газообразного водорода в энергетическое топливо, так и помочь биотеррористам с легкостью создать болезнетворные микробы.

Уже сейчас ученые начинают задумываться о последствиях, поскольку уже через 10 лет в их распоряжении будет высокопроизводительное недорогое секвенирование.

Материал подготовлен при участии Лаптевой Е.С. и Рыженковой О.Н.